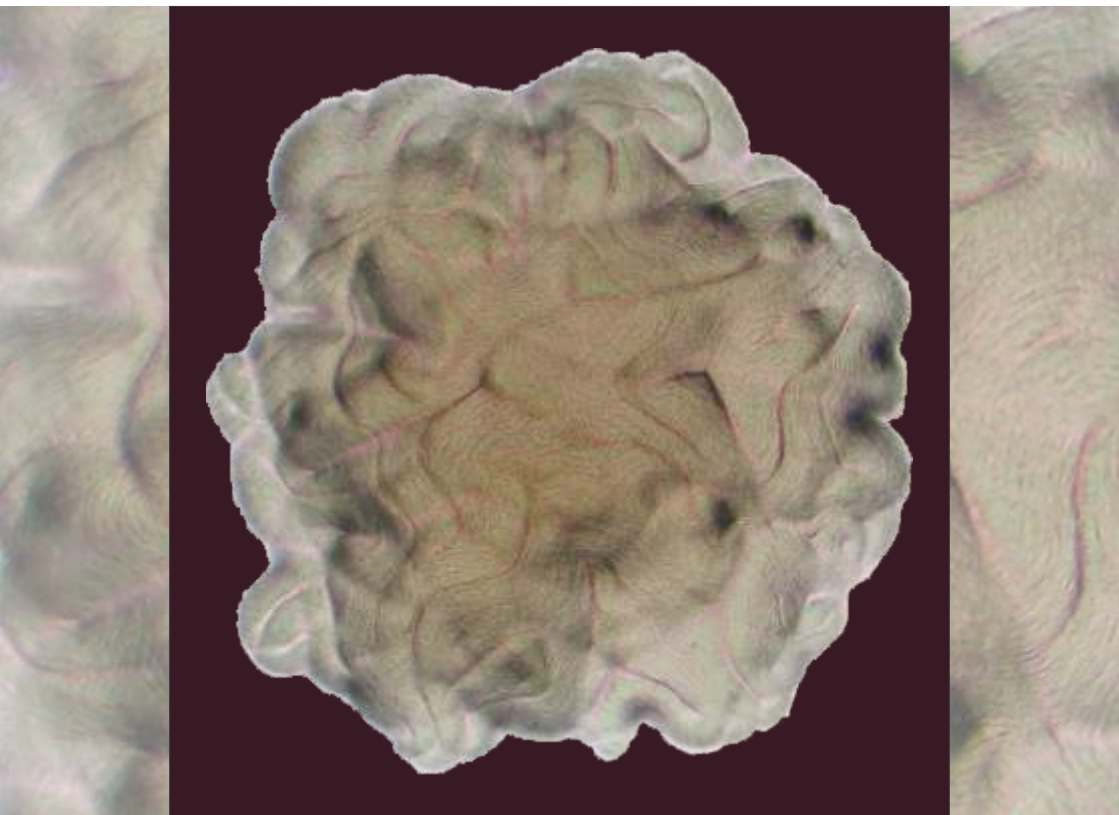


Columnarrose: Etiologia, Sinais Clínicos e Envio de Amostras para Análise Laboratorial



ISSN 1516-845X

Setembro, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agropecuária Oeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 109

Columnaríose: Etiologia, Sinais Clínicos e Envio de Amostras para Análise Laboratorial

Fabiana Pilarski

Márcia Mayumi Ishikawa

Fernanda de Alexandre Sebastião

Santiago Benites de Pádua

Róberson Sakabe

Embrapa Agropecuária Oeste
Dourados, MS
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agropecuária Oeste

BR 163, km 253,6 - Trecho Dourados-Caarapó

Caixa Postal 661 - 79804-970 Dourados, MS

Fone: (67) 3416-9700 - Fax: (67) 3416-9721

www.cpao.embrapa.br

E-mail: sac@cpao.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Guilherme Lafourcade Asmus*

Secretário-Executivo: *Alexandre Dinnys Roese*

Membros: *Claudio Lazzarotto, Éder Comunello, Milton Parron Padovan,*

Silvia Mara Belloni e Walder Antonio Gomes de Albuquerque Nunes

Membros suplentes: *Alceu Richetti e Oscar Fontão de Lima Filho*

Supervisão editorial: *Eliete do Nascimento Ferreira*

Revisão de texto: *Eliete do Nascimento Ferreira*

Normalização bibliográfica: *Eli de Lourdes Vasconcelos*

Foto da capa: *Santiago Benites de Pádua*

Editoração eletrônica: *Eliete do Nascimento Ferreira*

1ª edição

1ª impressão (2011): 1.000 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei Nº 9.610).

CIP-Catálogo-na-Publicação.

Embrapa Agropecuária Oeste.

Columnarirose: etiologia, sinais clínicos e envio de amostras para análise laboratorial / Fabiana Pilarski ... [et al.]. – Dourados, MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011.

32 p. : il. color. ; 21 cm. – (Documentos / Embrapa Agropecuária Oeste, ISSN 1516-845X ; 109).

1. Peixe - Doença - Bactéria - Detecção - Análise. 2. *Flavobacterium columnare*. 3. Bactéria - Peixe - Análise. I. Pilarski, Fabiana. II. Série.

Autores

Fabiana Pilarski

Bióloga, Dra. em Aquicultura, pesquisadora do Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Jaboticabal, SP.

E-mail: fabianap@caunesp.unesp.br

Márcia Mayumi Ishikawa

Médica Veterinária, Dra. em Parasitologia Veterinária, pesquisadora da Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS.

E-mail: marcia@cpao.embrapa.br

Fernanda de Alexandre Sebastião

Doutoranda do Curso de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP.

E-mail: fernanda.sebastiao@gmail.com

Autores

Santiago Benites de Pádua

Mestrando do Centro de Aquicultura da Unesp, (CAUNESP), Jaboticabal, SP.
Email: santiagopadua@live.com

Róberson Sakabe

Zootecnista e Médico Veterinário, Dr. em Aquicultura, Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Jaboticabal, SP.
Email: rsakabe@yahoo.com.br

Apresentação

A crescente demanda por alimentos, em função do aumento populacional e da melhoria do poder aquisitivo das populações, principalmente, exige que sejam desenvolvidas tecnologias que propiciem a melhoria dos níveis de produtividade, aliadas à sustentabilidade. Uma das alternativas para melhorar a oferta de alimentos é a criação intensiva de animais, dentre eles o peixe. A piscicultura é importante tanto do ponto de vista econômico para aqueles que se dedicam à atividade, quanto como alternativa de produção de proteína de origem animal.

Com a intensificação dos sistemas de produção, cuidados especiais são necessários, especialmente no que se refere à questão sanitária, pois, em condições adversas, os animais estão sujeitos a contrair doenças causadas por diferentes agentes etiológicos que, se não controladas adequadamente, podem comprometer a sustentabilidade da atividade.

Para o controle de doenças podem ser utilizadas várias estratégias, sendo o controle preventivo o mais recomendado. Este se fundamenta basicamente em práticas de manejo. O controle curativo exige primeiramente que se conheça com precisão a enfermidade que eventualmente esteja atacando os animais, ou seja, exige diagnóstico preciso da doença. Muitas vezes, para o controle de uma determinada doença faz-se necessário o uso de produtos químicos; no entanto, se utilizados de forma incorreta podem não controlar a doença, provocar danos ambientais e, em alguns casos, contribuir para a

indução de resistência a determinados grupos químicos. Desta forma, entendemos que para o controle de uma determinada doença é fundamental conhecer a etiologia e os sinais clínicos, assim como coletar e encaminhar material para análise laboratorial, o que muitas vezes é indispensável para se obter um diagnóstico correto.

Com o objetivo de disponibilizar informações para aqueles que trabalham nos diferentes elos da cadeia produtiva do peixe, a Embrapa Agropecuária Oeste, em parceria com pesquisadores e estudantes de pós-graduação do Centro de Aquicultura da UNESP - Jaboticabal, SP, coloca à disposição a publicação intitulada "Columnariose: etiologia, sinais clínicos e envio de amostras para análise laboratorial". Com mais esta publicação, espera-se contribuir para o avanço tecnológico da piscicultura.

Fernando Mendes Lamas

Chefe-Geral

Embrapa Agropecuária Oeste

Sumário

Columnariose: Etiologia, Sinais Clínicos e Envio de Amostras para Análise Laboratorial.....	11
Resumo.....	11
Introdução.....	12
Etiologia da bactéria.....	14
Sinais clínicos.....	15
Análise laboratorial.....	21
Informações sobre o local de coleta.....	22
Envio de amostras de água.....	23
Envio de amostras de peixes.....	25
Coleta de peixes.....	25
Utilidade das amostras enviadas.....	26
Amostras destinadas a análises microbiológicas.....	27

Considerações finais..... 28

Agradecimentos..... 28

Referências..... 28

Apêndice..... 32

Columnariose: Etiologia, Sinais Clínicos e Envio de Amostras para Análise Laboratorial

Fabiana Pilarski

Márcia Mayumi Ishikawa

Fernanda de Alexandre Sebastião

Santiago Benites de Pádua

Róberson Sakabe

Resumo

No Brasil, como em todo o mundo, as enfermidades bacterianas são motivo de preocupação constante, pois são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade de peixes e, quando não ocasionam mortalidade, provocam lesões que inviabilizam sua comercialização, causando grandes prejuízos econômicos. As bactérias com importância econômica para a piscicultura são consideradas oportunistas. Estão presentes na água e na microbiota dos peixes e desencadeiam enfermidades quando o hospedeiro encontra-se debilitado em decorrência de alguns fatores. Entre os quais, podemos ressaltar o estresse provocado por alterações na qualidade da água, associados à elevada densidade de estocagem de peixes, favorecendo o aumento de populações bacterianas e outros agentes patogênicos ou oportunistas. Dentre as bactérias de importância na piscicultura mundial está a *Flavobacterium columnare*, responsável pela enfermidade conhecida como columnariose, que acomete todas as espécies de peixes de água doce, principalmente na fase de alevinos. Um dos problemas da sanidade aquícola, no Brasil, é decorrente da falta de diagnóstico correto e confiável da columnariose, o que dificulta a aplicação de medidas curativas adequadas e a adoção de medidas preventivas. O problema inicia-se com a coleta e o armazenamento inadequado de amostras de peixes para garantir uma boa diagnose. A coleta adequada de amostras, tanto de água quanto de peixes,

associada ao fornecimento de informações relevantes pelo produtor, contribui para que o diagnóstico seja rápido e as soluções para o problema sejam tomadas com prontidão. Neste documento são apresentadas informações básicas sobre a columnariose, como definição do seu agente etiológico, os sinais clínicos e os procedimentos corretos para envio de amostras para diagnóstico laboratorial.

Introdução

A piscicultura, desde a última década, vem se consolidando e ocupando espaço, tanto no mercado nacional quanto no internacional. Entre as espécies importantes para esta atividade, encontram-se as nativas, como os peixes redondos representados pelo tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e pelo híbrido tambacu (*C. macropomum* x *P. mesopotamicus*), e os surubins, representados pelo pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), pela cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*) e pelo híbrido (*P. reticulatum* x *P. corruscans*), também conhecido popularmente como “ponto e vírgula”. A criação dessas espécies tem se expandido rapidamente nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (IBAMA, 2007), atribuído ao seu excelente potencial para produção intensiva, principalmente pela fácil obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, alta produtividade, resistência a baixos níveis de oxigênio dissolvido e excelente utilização de alimentos (ARAÚJO-LIMA; GOMES, 2005; ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998; MELO et al., 2001).

Todavia, a intensificação dos sistemas de produção tem promovido o aumento de diversas enfermidades, devido ao crescimento desordenado da atividade, acompanhado da falta de controle sanitário, o que tem colaborado para a ocorrência de altas taxas de mortalidade e produção de pescado com baixa qualidade.

Como em todo sistema intensivo de produção, a piscicultura não está livre de obstáculos que limitam sua produtividade. Os peixes são criados em altas densidades de estocagem, com alimentação e manejo inadequados, criando uma porta de entrada para epidemias e subseqüentes perdas econômicas

(MARTINS et al., 1998). As enfermidades bacterianas são de singular importância, pois são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade de peixes e, muitas vezes, há desistência da atividade por parte do produtor. Esses micro-organismos são essencialmente agentes oportunistas que invadem o tecido do hospedeiro debilitado pelos fatores de estresse ou por outras doenças.

As populações bacterianas normalmente estão presentes na água ou no muco dos peixes (reservatório natural). Alterações na qualidade da água, como aumento no teor de amônia; baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, bem como temperatura elevada, associadas à elevada densidade de estocagem de peixes, favorecem o aumento de populações bacterianas, que se disseminam por toda a criação, provocando enfermidades diversas com elevadas taxas de mortalidade (PAPERNA, 1996; SVOBODOVÁ; VYKUSOVÁ, 1991).

Quando as enfermidades ocorrem, a utilização de quimioterápicos é, frequentemente, a maneira mais efetiva de controlar as doenças e reduzir a oportunidade de transmissão de patógenos para todo o plantel. Todavia, a utilização dessas substâncias na piscicultura pode contaminar o ambiente, contribuir para o aparecimento de micro-organismos resistentes (patogênicos e saprófitas) e provocar impactos adversos em espécies não-alvo, colocando em risco toda a cadeia trófica.

No Brasil, esse quadro é ainda mais agravante devido, principalmente, à falta de informação sobre a biodiversidade dos ecossistemas aquáticos; carência de estudos a respeito dos produtos utilizados no tratamento de enfermidades de peixes; doses apropriadas; impactos gerados nos organismos alvo, não alvo e meio ambiente. Esse conjunto de fatores impede a sistematização de dados abrangentes, prejudicando o desenvolvimento de políticas e planejamentos de ação para os recursos hídricos (BUSS, 2002).

O conhecimento sobre as bactérias que provocam grandes prejuízos econômicos na piscicultura, como a *Flavobacterium columnare*, é de extrema importância, pois permitirá a adoção de medidas para minimizar os agentes estressores e, dessa forma, controlar epizootias, garantindo a saúde dos peixes e do consumidor, incrementando consideravelmente a produção brasileira de peixes nativos.

A grande dificuldade entre os produtores é determinar o momento exato de realizar a coleta e qual material coletar. Assim, este documento pode esclarecer e orientar os produtores e profissionais da área sobre este assunto.

Etiologia da Bactéria

O agente etiológico da columnariose é a bactéria *Flavobacterium columnare*, considerada um bacilo longo, Gram negativo, estritamente aeróbia, que não forma esporos e não possui flagelo (Figura 1a). Sua principal característica é a motilidade por deslizamento em superfícies sólidas. As colônias são planas, podendo adquirir três tipos de bordas: rizoide, mucoide ou em forma de favo de mel (SONG et al., 1988; TRIYANTO; WAKABAYASHI, 1999).

Em peixes com sinais clínicos evidentes dessa bacteriose pode-se realizar um raspado de secreção das lesões, para visualização dos bacilos que sugerem a presença de *F. columnare* (Figura 1c). Pode-se também proceder à coloração do material colhido com azul de metileno (0,5%) para melhor visualização da bactéria (Figura 1b).

Sua multiplicação é por divisão transversa, frequentemente dentro de duas células de tamanho aproximadamente igual (CARLSON; PACHA, 1968). A virulência desta bactéria deve-se à habilidade de fixação no tecido do hospedeiro, por meio de adesinas, e de evadir-se das barreiras físicas de defesa (DECOSTERE et al., 1999a, 1999b); a secreção da enzima condroitina AC liase está relacionada a sua capacidade de invasão dos tecidos (SUOMALAINEN et al., 2006). Essa bactéria não possui especificidade, acometendo praticamente todas as espécies de peixes cultivados (DARWISH; MITCHELL, 2009; PILARSKI et al., 2008; SEBASTIÃO et al., 2010).

Fotos: Fabiana Pilarski

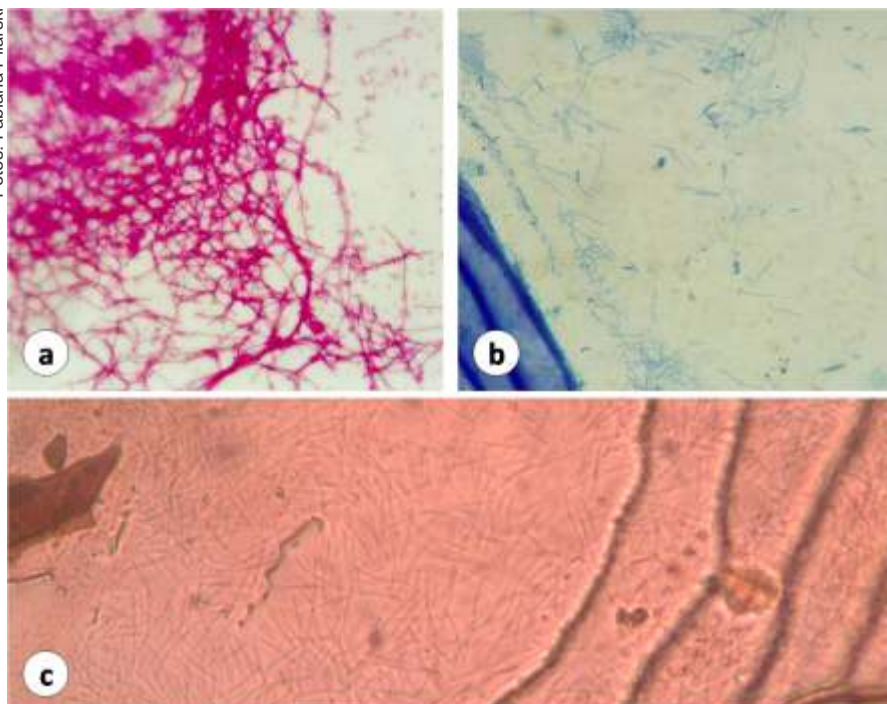


Figura 1. *Flavobacterium columnare* observada em microscopia óptica de luz (x1.000): coloração de Gram, exibindo bacilos longos Gram negativos (a), bacilos corados com azul de metileno 0,5 % (b) e bacilos longos presentes em escamas de peixes em exame a fresco, realizado a partir de raspado da lesão (c).

Sinais Clínicos

Os peixes acometidos pela columnariose apresentam sintomas iniciais não específicos e incluem letargia, inapetência, natação errática, movimentos operculares acelerados, pontos acinzentados ou áreas amareladas de erosão, usualmente envoltas por uma zona avermelhada na cabeça, superfície corporal e brânquias. Com a progressão da doença estes locais apresentarão necroses envolvendo a epiderme, derme e musculatura (DAVIS, 1923; PACHA e ORDAL, 1970; FARKAS e OLAH, 1986; BERTOLINI e ROHOVEC, 1992).

Em experimentos realizados pelo Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos, do Centro de Aquicultura da UNESP (LAPOA), observou-se o ataque de peixes sadios aos peixes enfermos, possivelmente como forma de eliminar fonte de enfermidade do ambiente aquático e proliferação do patógeno.

A enfermidade pode apresentar diferentes manifestações clínicas, com sintomas combinados entre brânquias, pele ou nadadeiras (TRIPATHI, 2003). Na superfície corporal, pequenas lesões iniciam-se, como áreas despigmentadas, propagando-se até a base da nadadeira dorsal ou, ocasionalmente, até a base da nadadeira pélvica, promovendo a deterioração das nadadeiras (Figura 2). Estas áreas aumentam em tamanho e podem chegar a 3 cm-4 cm de diâmetro, cobrindo 20%-25% da superfície corporal dos peixes, onde a pele fica completamente corroída, expondo a musculatura (AUSTIN; AUSTIN, 1989).

Fotos: Santiago Benites de Pádua



Figura 2. Surubim híbrido juvenil exibindo sinais clínicos de columnariose. Área com perda de pigmentação no pedúnculo caudal (a) e ulceração não hemorrágica no pedúnculo caudal (b).

As lesões são cobertas por exudato amarelado, onde é encontrado grande número de *F. columnare* (JENEY; JENEY, 1995) e por isso é comum a morte do peixe em 48 horas após o surgimento da despigmentação na pele (WAKABAYASHI, 1991). Quando essas lesões ocorrem ao redor da nadadeira dorsal a doença é denominada de “doença da sela” (AUSTIN; AUSTIN, 1989; BOOTSMA; CLERX, 1976; DECOSTERE et al., 1999b).

Quando a columnariose ocorre nas brânquias o curso da enfermidade varia de dois a cinco dias, com elevada taxa de mortalidade, pois ocorre a destruição dos filamentos, iniciando-se na periferia das brânquias e estendendo-se da parte distal em direção à base. A proliferação de massas bacterianas provoca hiperplasia do epitélio branquial com fusão de lamelas. Estas se tornam congestionadas pelo acúmulo de massas lobosas de sangue, promovendo a interrupção da troca de gases entre a água e a corrente sanguínea. A hiperplasia do epitélio branquial e a hiperprodução de muco preenchem o espaço interlamelar e limitam a absorção de oxigênio pelas brânquias, provocando a morte do peixe por asfixia ((DECOSTERE et al., 2002; RUCKER et al., 1952; WOOD; YASUTAKE, 1957).

Peixes jovens geralmente são acometidos pela enfermidade na forma subaguda, onde apresentam acentuado movimento opercular e frequentemente morrem 48 horas após o surgimento dos sinais clínicos (DECOSTERE et al., 2002). Nesta etapa, características como descoloração da pele, nadadeiras e ulcerações não são observadas (BULLOCK et al., 1968).

Na fase crônica, os peixes apresentam lesões na superfície corporal e nas brânquias. A distribuição dessas lesões varia de acordo com a espécie envolvida. Em peixes de couro as lesões iniciam-se com áreas despigmentadas até atingir a base da nadadeira dorsal. Porém, as lesões também podem ser observadas na região craniodorsal (DECOSTERE et al., 1999a).

Em peixes de escama necroses são frequentemente observadas; porém, úlceras na superfície corporal podem estar presentes, mesmo não sendo observadas lesões nas brânquias ou nadadeiras (NIRAJ, 2003).

Todos os sinais clínicos descritos são provocados pela liberação de potentes enzimas proteolíticas, responsáveis pela ação patogênica da *F. columnare* (PACHA; ORDAL, 1970).

O progresso da columnariose é variável. Em tanques, lagos e rios com temperaturas elevadas os peixes são acometidos pela doença. Nesses casos, podem ser observadas extensas áreas necrosadas na superfície corporal, progredindo para a septicemia, onde a mortalidade ocorre devido à perda de eletrólitos e de proteínas ou pelo choque septicêmico. Nessas lesões, geralmente, são observadas bactérias longas e finas, exibindo movimentos flexíveis e capazes de formar colunas (DECOSTERE et al., 1997). Em casos de columnariose crônica a morte do peixe provavelmente ocorre devido à liberação de toxinas bacterianas ou da resposta do hospedeiro (BULLOCK et al., 1961). As Figuras 2 a 8 apresentam peixes exibindo esses sinais clínicos característicos da infecção por *F. columnare*.

Foto: Santiago Benites de Pádua



Figura 3. Surubim híbrido com sinais clínicos de columnariose. Ulceração restrita ao pedúnculo caudal com acometimento da nadadeira adiposa e caudal.

Foto: Fabiana Pilarski



Figura 4. Catfish apresentando sinais clínicos de columnariose. Manchas acinzentadas na região dorsal, caudal e ventral que evoluíram para exposição da musculatura.

Foto: Fernanda de Alexandre Sebastião



Figura 5. Tambaqui acometido por columnariose exibindo extensa lesão de coloração acinzentada no tegumento, com perda de escamas e corrosão das nadadeiras.

Foto: Fabiana Pilarski



Figura 6. Pacu com início de columnariose. Pequenas lesões de coloração acinzentadas próximo às nadadeiras dorsal e peitoral e também corrosão das nadadeiras.

Foto: Fabiana Pilarski



Figura 7. Pacu com sinais clínicos de columnariose. Manchas acinzentadas por toda a superfície corporal e acentuada corrosão de nadadeiras, principalmente caudal e dorsal.

Foto: Fabiana Pilarski



Figura 8. Tambaqui com lesões características de columnariose por todo o tegumento (manchas acinzentadas).

Análise Laboratorial

As técnicas de diagnóstico de enfermidades de peixes não diferem muito das utilizadas para outras espécies animais; entretanto, as diferenças mais importantes relacionam-se à falta de conhecimento a respeito das doenças que acometem os peixes. O diagnóstico, na maioria das vezes, restringe-se a observação de sinais clínicos, o que aumenta sua probabilidade de erro e, consequentemente, o tratamento incorreto com medicamentos sem prescrição, já que não existe no Brasil uma legislação que regulamente o uso de medicamentos em piscicultura.

O que se observa, com frequência, é a formação de um ciclo vicioso: quando um tratamento não funciona, outro é tentado e assim sucessivamente, gerando perda de tempo e custo oneroso, sendo o peixe o principal prejudicado, pois acaba suscetível a infecções secundárias.

Por essa razão, recomenda-se ao produtor contatar um laboratório especializado no diagnóstico de enfermidades de peixes assim que anormalidades forem detectadas, tais como perda do apetite, peixes

isolados do cardume, próximos à entrada d'água ou na superfície do viveiro/tanque. Desse modo, o produtor receberá orientação quanto às medidas que devem ser adotadas com relação ao manejo. Deve-se ter em mente que a maioria das enfermidades que ocorre na piscicultura são decorrentes de erros cometidos no manejo, principalmente com relação à qualidade da água, dieta fornecida aos peixes, densidade de estocagem e a falta de um diagnóstico preciso.

Quanto a enfermidades provocadas por bactérias, o êxito no isolamento de um patógeno depende da coleta e do armazenamento adequado das amostras para garantir representatividade e confiabilidade no resultado (MPSC, 2009). A seguir serão descritos procedimentos apropriados para a coleta e o envio de amostras de peixes e água, para o laboratório de diagnóstico de enfermidades de peixes.

Informações sobre o Local de Coleta

Antes da coleta das amostras deve-se agendar o recebimento do material pelo laboratório e informar as seguintes observações (KLINGER; FRANCIS-FLOYD, 2005):

- ▷ **Origem das amostras:** local de coleta da amostra (nome, endereço e telefone do proprietário);
- ▷ **alimentação:** tipo e tamanho do alimento, quantidade, frequência, alteração no tipo de alimentação e na sua manutenção. Relatar se os peixes estão comendo e, em caso negativo, informar quando pararam de se alimentar;
- ▷ **comportamento dos peixes:** quando foi notado o primeiro comportamento anormal ou morte; se a natação está de forma errática, letárgica, como está a taxa de respiração (aumentada, diminuída) e a posição do peixe na coluna d'água (superfície, vertical, deitado no fundo, perto do aerador ou beirada do tanque);

- ▷ **porcentagem de mortalidade em cada viveiro ou tanque:** qual o número de peixes doentes e mortos por dia;
- ▷ **características físico-químicas da água:** oxigênio dissolvido, temperatura, pH, amônia e nitrito e se houve mudança nas condições ambientais;
- ▷ **manejo recente realizado nos peixes:** se houve adições recentes, quais espécies e a época (data); quando foi a última troca de água e qual a quantidade trocada e se houve manipulação dos peixes recentemente;
- ▷ **características dos viveiros:** tamanho, profundidade, forma e idade do sistema envolvido, captação de água; quando foi realizada a limpeza do fundo e densidade de peixes. Quais as espécies e o número de cada uma no sistema e quais delas estão com problemas;
- ▷ **relação das enfermidades ocorridas anteriormente:** se já houve problemas no sistema anteriormente e se foi com esta espécie;
- ▷ **tratamentos utilizados:** quando foi o último tratamento, qual o tipo de tratamento e a dosagem utilizada;
- ▷ **observações do peixe:** condições do corpo do peixe (magro, inchado), olhos (normais, afundados ou saltados), nadadeiras (desgastadas ou sangrentas), brânquias (descoloridas, sangrentas ou desgastadas), se existem lesões ou crescimentos no peixe e outras anormalidades; e
- ▷ **outras informações que forem necessárias:** fotografias, etc.

Envio de Amostras de Água

Água de má qualidade pode ser o principal fator contribuinte para enfermidades e mortalidade de peixes. Como constituinte das boas práticas de manejo, recomenda-se a rotina de monitoramento das características físico-químicas da água da piscicultura, pois tal prática auxilia na identificação de problemas, antes do início das mortalidades.

As análises de oxigênio dissolvido e temperatura devem ser feitas no local, enquanto as análises de pH, amônia, nitrito e microbiológicas devem ser enviadas para laboratório (ROTTMANN, 1992).

A coleta de amostras para exame microbiológico deve ser realizada sempre antes da coleta de água, para qualquer outro tipo de análise. Tal procedimento visa evitar a contaminação do local da amostragem com frascos não estéreis ou remoção do sedimento.

As amostras de água devem ser coletadas em frascos esterilizados, com capacidade para no mínimo 1L, e mantidas refrigeradas, desde a sua coleta até o transporte ao laboratório. Os frascos de coleta devem ser resistentes, de vidro borosilicato âmbar ou polietileno; devem ser quimicamente inertes e permitir uma perfeita vedação. As tampas devem ser, preferencialmente, do tipo auto-lacráveis, permitindo assim uma maior confiabilidade na amostra. Os frascos destinados às análises microbiológicas devem ser resistentes à autoclavagem.

Para a coleta, deve-se remover a tampa do frasco, tomando todos os cuidados de assepsia. Com uma das mãos segurar o frasco pela base, mergulhando-o rapidamente com a boca para baixo, a cerca de 15 cm a 30 cm abaixo da superfície da água. Inclinar o frasco lentamente para cima, para permitir a saída do ar e consequente enchimento do mesmo, evitando bolhas, e fechar imediatamente o frasco. Identificar a amostra com as informações apropriadas, como nome do proprietário, local da amostra, tamanho e profundidade do tanque/viveiro, além do horário da coleta.

Para o transporte, colocar as embalagens dentro de caixas de isopor, com gelo reciclável ou garrafas PET com água congelada, ou ainda cubos de gelo isolados em saco plástico. Jamais colocar cubos de gelo soltos, para evitar o acúmulo de água e consequente contaminação da amostra. Envolver as embalagens com jornal para preencher espaços vazios e evitar impacto durante o transporte. Prender firmemente a tampa da caixa e identificar a amostra pelo lado de fora, indicando sua procedência, destino e data de envio e indicações de “PARA CIMA”, “FRÁGIL” e “PERECÍVEL”, escritas de modo perfeitamente legível (MANUAL..., 2009).

Quando houver diferentes sistemas na mesma propriedade, deve-se coletar uma amostra para cada um deles e, no caso do sistema do tipo tanque-rede,

deve-se coletar a água tanto dentro quanto fora dele. Notar que a amostra de água deve ser separada da amostra de peixe, pois o metabolismo do peixe altera as propriedades da água. As amostras de água podem ser enviadas na mesma remessa de amostras de peixe congeladas, mas sempre em recipientes diferentes (KLINGER; FRANCIS-FLOYD, 2005).

Envio de Amostras de Peixes

O envio de amostras de peixes é o fator principal para o diagnóstico preciso da causa da mortalidade em um tanque de criação e um motivo de dúvida entre proprietários. Para resultados confiáveis é necessário garantir que a amostra seja representativa e o método utilizado para coleta dos materiais promova resultados livres de contaminações (MANUAL..., 2009).

Coleta de peixes

Para um diagnóstico preciso a amostra deve ser representativa, ou seja, deve variar de três a seis peixes de cada tanque para que seja possível determinar, com confiança, qual patógeno é responsável pela doença em questão. É importante lembrar que os peixes destinados à amostra devem ser capturados com puçá e nunca pescados, pois os peixes doentes param de se alimentar e a chance de capturar um peixe sadio para análise é grande, mascarando o diagnóstico.

Outro fator importante é, sempre que possível, enviar amostras de peixes vivos com sinais de comportamento anormal como:

- ▷ letargia (insensibilidade);
- ▷ anorexia (falta de apetite);
- ▷ perda de equilíbrio, nado em espiral, círculo ou vertical;
- ▷ agrupamento na superfície;
- ▷ respiração aumentada (maior batimento opercular);
- ▷ produção excessiva de muco, provocando aparência opaca;

- ▷ erosão na pele ou nadadeiras;
- ▷ brânquias inflamadas, erosionadas ou pálidas;
- ▷ abdômen inflado (às vezes repleto de líquido);
- ▷ ânus inchado ou enrijecido;
- ▷ exoftalmia (olhos salientes) ou enoftalmia (retração anormal do olho);
- ▷ apatia, pouco reflexo a estímulos;
- ▷ boqueamento na superfície ou na entrada d'água;
- ▷ peixes isolados do cardume;
- ▷ qualquer outra mudança observada; e
- ▷ morte.

Sempre que possível, os peixes vivos devem ser transportados em recipientes adequados, contendo água e aeração, ou em sacos duplos de plástico com oxigênio. O volume de oxigênio deve ser maior que o volume de água, recomendando-se $\frac{3}{4}$ de oxigênio. Como regra geral colocam-se até cinco alevinos por litro de água (independente da espécie). Quando necessário o uso de sacos plásticos, estes devem ser vedados e colocados em caixas de isopor.

Embora seja preferível contar com amostras de peixes vivos e doentes, é possível fazer algumas análises com peixes congelados. Neste caso, os peixes devem ser empacotados individualmente em sacos plásticos limpos (não usar sacos de lixo), os quais devem ser colocados em recipiente contendo gelo seco, assegurando ventilação adequada e evitando o acúmulo de pressão gasosa dentro do recipiente. Fazer o envio por transportadora ou avião, quando a distância até o laboratório for muito grande.

Utilidade das amostras enviadas

Uma vez que a qualidade das amostras é fator determinante para um diagnóstico preciso da presença de patógenos nos peixes, a Tabela 1 lista de maneira resumida a utilidade dessas amostras.

Tabela 1. Utilidade de amostras para diagnóstico de espécies de patógenos.

	<i>Parasitas externos</i>	<i>Parasitas internos</i>	<i>Isolamento bacteriano</i>	<i>Isolamento viral</i>	<i>Alterações celulares</i>
Vivo	Ótimo	Ótimo	Ótimo	Ótimo	Ótimo
Morto	Ruim	Bom	Ruim	Suficiente	Ruim
Resfriado	Suficiente/Bom	Bom	Suficiente	Bom	Ruim
Congelado	Suficiente	Bom	Bom	Bom	Ruim
Fixado	Suficiente/Bom	Suficiente/Bom	Ruim	Ruim	Ótimo

Klinger e Francis-Floyd (2005).

Os peixes indicados como “mortos” são aqueles que morreram 12 horas antes da coleta e envio. Já os “resfriados” ou “congelados” são os peixes doentes acondicionados em gelo ou que foram imediatamente congelados para o transporte. Os “fixados” são aqueles que foram previamente processados na propriedade antes do envio.

Amostras destinadas a análises microbiológicas

É necessário sempre ter contato com algum laboratório de análise microbiológica da região onde se encontra a piscicultura, para facilitar o diagnóstico, evitando a proliferação de bactérias indesejáveis e confiabilidade nos resultados. O grande problema enfrentado no Brasil, com relação ao diagnóstico de enfermidades bacterianas de peixes, é a falta de laboratórios especializados neste tipo de análise, pois a identificação e o isolamento de bactérias oportunistas são complexos. Os proprietários devem entrar em contato com o responsável pelo laboratório que realiza esse serviço, para conhecer quais os procedimentos exigidos pelo laboratório, como horário de recebimento de material, embalagem e conservação de amostras de peixes, entre outras exigências. O correto é fazer este contato antes que surtos de doenças ocorram, pois conhecendo o funcionamento do laboratório ficará mais fácil agendar e programar análises (KLINGER; FRANCIS-FLOYD, 2005). No Apêndice 1 são citados dois laboratórios que realizam análises microbiológicas no Brasil.

Considerações Finais

Enfermidades bacterianas em peixes são comuns em sistemas aquáticos, porém práticas de manejo adequadas podem prevenir mortalidades. Para que um diagnóstico preciso e confiável seja realizado é necessária a contribuição do piscicultor, no sentido de fornecer dados corretos sobre o sistema de criação, manejo empregado, espécies utilizadas, tratamentos utilizados, enfermidades já identificadas na propriedade, qualidade da água e, principalmente, enviar amostras de peixes e água adequadas. Dessa forma, o diagnóstico será rápido e as soluções para o problema tomadas com prontidão.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), pelo apoio financeiro materializado através do Projeto Aquabrazil.

Referências

- ARAÚJO-LIMA, C.; GOMES, L. C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria, RS: Editora UFSM, 2005. p. 175-202.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui**: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefe: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília, DF: CNPq, 1998. 186 p. (Estudos do Mamirauá, 4).
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D. A. **Bacterial fish pathogens**: disease in farmed and wild fish. Chichester: Ellis Horwood, 1989. 364 p.

BERTOLINI, J. M.; ROHOVEC, J. S. Electrophoretic detection of proteases from different *Flexibacter columnaris* strains and assessment of their variability. **Diseases of Aquatic Organisms**, Winsen, v. 12, p. 121-128, 1992.

BOOTSMA, R.; CLERX, J. P. M. Columnaris disease of cultured carp (*Cyprinus carpio*); characterization of the causative agent. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 371-384, Apr. 1976.

BULLOCK, G. L. The bacteriology of brook trout with tail rot. **Progressive Fish Culturist**, Washington, DC, v. 30, n. 1, p. 19-22, Jan. 1968.

BULLOCK, G. L. A schematic outline for the presumptive identification of bacterial diseases of fish. **Progressive Fish Culturist**, Washington, DC, v. 23, n. 4, p. 147-151, Oct. 1961.

BUSS, D. F. Proteção à vida aquática, participação das comunidades e políticas de recursos hídricos. **Ciência e Ambiente**, Santa Maria, RS, n. 25, p. 71-84, jul./dez. 2002.

CARLSON, R. V.; PACHA, R. E. Procedure for the isolation and enumeration of myxobacteria from aquatic habitats. **Applied Microbiology**, Washington, DC, v. 16, n. 5, p. 795-796, May 1968.

DARWISH, A. M.; MITCHELL, A. J. Evaluation of diquat against an acute experimental infection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Aquaculture Research**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 401-408, May 2009.

DAVIS, H. S. A new bacterial disease of fresh water fishes. **Bulletin of the Bureau of Fisheries**, v. 28, p. 261-280, 1923.

DECOSTERE, A. *Flavobacterium columnare* infections in fish, the agent and its adhesion to the gill tissue. **Verhandelingen van de Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België**, Brussel, v. 64, p. 421-430, 2002.

DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F.; CHARLIER, G.; DUCATELLE, R. The association of *Flavobacterium columnare* strains of high and low virulence with gill tissue of black mollies (*Poecilia sphenops*). **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 4, p. 287-298, July 1999a.

DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F.; DEVRIESE, L. A. Shieh medium supplemented with tobramycin for selective isolation of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) from diseased fish. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 35, n. 1, p. 322-324, Jan. 1997.

DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F.; VAN DRIESSE, E.; CHARLIER, G.; DUCATELLE, R. Characterization of the adhesion of *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) to gill tissue. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 465-474, Dec. 1999b.

FARKAS, J.; OLÁH, G. Gill necrosis: a complex disease of carp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 58, n. 1/2, p. 17-26, Nov. 1986.

IBAMA. **Estatística da pesca 2007**: Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Brasília, DF, 2007. 151 p. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/wp-content/files/estatistica_2007.pdf>. Acesso em: jun2009.

JENEY, Z.; JENEY, G. Recent achievements in studies on diseases of common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 129, n. 1/4, p. 397-420, Jan. 1995.

KLINGER, R. E.; FRANCIS-FLOYD, R. **Submission of fish for diagnostic evaluation**. Gainesville: University of Florida, IFAS Extension, 2005. 6 p. (Florida Cooperative Extension Service. Fact Sheet, FA55).

MANUAL técnico para coleta de amostras de água. Florianópolis: [s.n.], 1990. 37 p. Disponível em: <http://www.mp.sc.gov.br/portal/site/conteudo/cao/cme/atividades/recursos_hidricos/manual_coleta_água.pdf>. Acesso em: jun. 2009.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MALHEIROS, E. B. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum: biological sciences**, Maringá, v. 22, n. 2, p. 545-552, 1998.

MELO, L. A. S.; IZEL, A. C. U.; RODRIGUES, F. M. **Criação de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em viveiros de argila/barragens no Estado do Amazonas**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2001. 30 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 18).

PACHA, R. E.; ORDAL, E. J. Myxobacterial diseases of salmonids. In: SNIESZKO, S. F. (Ed.). **A symposium on diseases of fishes and shellfishes**. Washington, DC: American Fisheries Society, 1970. p. 243-257. (AFS. Special publication, n. 5).

PAPERNA, I. **Parasites, infections and diseases of fishes in Africa**: An update. Rome: FAO, 1996. 220 p. (CIFA. Technical paper, n. 31).

PILARSKI, F.; ROSSINI, A. J.; CECCARELLI, P. S. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, SP, v. 68, n. 2, p. 409-414, May 2008.

ROTTMANN, R. W.; FRANCIS-FLOYD, R.; REED, P. A.; DURBOROW, R. **Submitting a sample for fish kill investigation**. Stoneville: Southern Regional Aquaculture Center, 1992. 4 p. (SRAC Publication, n. 472).

RUCKER, R. R.; JOHNSON, H. E.; KAYDAS, G. M. An interim report on gill disease. **Progressive Fish Culturist**, Washington, DC, v. 14, n. 1, p. 10-14, Jan. 1952.

SEBASTIÃO, F. A.; PILARSKI, F.; LEMOS, M. V. F. Isolation and molecular characterization of *Flavobacterium columnare* strains from fish in Brazil. **Journal of Bacteriology Research**, Victoria Island, v. 2, n. 3, p. 22-29, 2010.

SONG, Y. L.; FRYER, J. L.; ROHOVEC, J. S. Comparison of six media for the cultivation of *Flexibacter columnaris*. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 23, p. 91-94, 1988.

SUOMALAINEN, L.-R.; TIROLA, M.; VALTONEN, E. T. Chondroitin AC lyase activity is related to virulence of fish pathogenic *Flavobacterium columnare*. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 29, n. 11, p. 757-763, Nov. 2006.

SVOBODOVÁ, Z.; VYKUSOVÁ, B. **Diagnostics, prevention and therapy of fish diseases and intoxications**. Czechoslovakia: Svobodová & Vykusová, 1991. 270 p.

TRIPATHI, N. K. **Pathogenesis and treatment of *Flavobacterium columnare* induced dermatitis in koi**. 2003. 169 p. Thesis (Ph. D.) - University of Georgia, Athens.

TRIYANTO, A. K.; WAKABAYASHI, H. Genotypic diversity of strains of *Flavobacterium columnare* from diseased fishes. **Fish Pathology**, Tokyo, v. 34, n. 2, p. 65-71, 1999.

WAKABAYASHI, H. Effect of environmental conditions on the infectivity of *Flexibacter columnaris* to fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 279-290, May 1991.

WOOD, E. M.; YASUTAKE, W. T. Histopathology of fish (gill disease). **Progressive Fish Culturist**, Washington, DC, v. 19, n. 1, p. 7-13, Jan. 1957.

Apêndice

A seguir estão listados dois laboratórios que realizam análises microbiológicas para diagnóstico de enfermidades de peixes no Brasil. Funcionam de segunda-feira à sexta-feira, em horário comercial, e apresentam um custo para realização das análises. Todos os laboratórios precisam ser notificados com antecedência para agendamento do recebimento das amostras coletadas.

- ▮ Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (LAPOA),
Centro de Aquicultura da Unesp. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/nº
14884-900 Jaboticabal, SP
Telefone: (16) 3203-2110, ramal 206
E-mail: fabianap@caunesp.unesp.br

- ▮ Laboratório de Imunopatologia de Peixes,
Universidade Estadual do Norte do Paraná - Campus Luiz Meneghel
Rodovia BR, 369, km 54, Caixa Postal 261
86360-000 Bandeirantes, PR
Telefone: (43) 3354-2800.
E-mail: salvador@uenp.edu.br



Agropecuária Oeste

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

